

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Speciální chemicko-biologické obory
Molekulární biologie a biochemie organismů



Kateřina Rejlová

Role genu HOXA9 v leukemogenezi
The role of HOXA9 gene in leukemogenesis

Bakalářská práce

Školitel: Mgr. Júlia Starková, PhD.

Praha, 2011

Poděkování:

Ráda bych poděkovala své školitelce Mgr. Júlíi Starkové, PhD. za odborné vedení, pomoc a rady, které mi věnovala při zpracování této práce.

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 6. 5. 2011

Podpis:

Abstrakt

Evolučně konzervovaná rodina homeoboxových genů hraje důležitou roli ve vývoji anterior-posteriorní osy těla obratlovců. Významným způsobem také ovlivňuje vývoj krevních buněk neboli hematopoézu. Rozsáhlé výzkumy homeoboxových genů v oblasti hematopoézy přispěly k prokázání vlivu těchto genů rovněž v leukemogenezi. Vzhledem k tomu, že leukémie neboli maligní onemocnění krevních buněk je jednou z nejčastějších malignit v dětském věku, výzkum tohoto onemocnění se stal stěžejním pro řadu vědců. Do dnešní doby se však neprokázalo, které stádium maligní transformace homeoboxové geny ovlivňují. Dále se rovněž zkoumá, zdali je jejich význam v patogenezi klíčový, nebo mají-li pouze vedlejší efekt. Nejvíce prozkoumaný homeoboxový gen v leukemogenezi je gen *HOXA9*, u něhož byla prokázána korelace s prognózami pacientů u některých leukémiích. V mnoha studiích byl popsán vliv *HOXA9* na leukemickou transformaci buněk, z čehož lze usuzovat, že by tento gen mohl být slibným cílem budoucí leukemické terapie. Tato práce je zaměřena především na gen *HOXA9* a jeho spojení s leukemickou transformací krevních buněk.

Klíčová slova: leukémie, homeoboxové geny, *HOXA9*, hematopoéza

Abstract

The evolutionarily conserved family of homeobox genes plays an important role in the development of the anterior-posterior body axis of vertebrates. These genes significantly affect hematopoiesis, the development of blood cells. Extensive studies on homeobox genes in normal hematopoiesis confirmed their role also in leukemogenesis. Since the neoplastic transformation of blood cells, *i.e.* leukemia, is the most frequent malignancy in children, it has become a major subject of research for many scientists. Precisely in what stage of the malignant transformation the homeobox genes take part has not been shown yet. Neither is it known whether HOX genes are crucial in pathogenesis or whether their deregulation is only a side effect of leukemogenesis. The most studied homeobox gene in leukemogenesis is the HOXA9 gene, which showed correlation with the prognosis of patients with certain leukemias. Many studies describe the effect of HOXA9 in leukemic cell transformation, suggesting this gene could be a promising future target in leukemia therapy. This work is focused on the HOXA9 gene and its association with leukemic transformation of blood cells.

Keywords: leukemia, homeobox genes, HOXA9, hematopoiesis

Seznam zkratek

ABD-B	abdominal B
ABL	c-abl oncogen
ALL	akutní lymfoblastická leukémie
AML	akutní myeloidní leukémie
AML1 (RUNX1)	runt-related transcription factor 1
ANT-C	antennapedia
APL	akutní promyelocytární leukémie
BAD	BCL2-associated agonist of cell death
BCL-2	B-cell CLL/lymphoma 2
BCR	breakpoint cluster region
BMI1	BMI1 polycomb ring finger oncogene
BMP	bone morphogenetic protein
CBF	core binding factor
CDX2	caudal type homeobox 2
CDX4	caudal type homeobox 4
CLL	chronické lymfatické leukémie
CLP	common lymphoid progenitor
CML	chronická myeloidní leukémie
CMP	common myeloid progenitor
C-MYB	v-myb myeloblastosis viral oncog.homolog
CpG	cytosine-phospho-guanin dinukleotid
CYBB	cytochrome b-245, beta polypeptid
E2A (TCF3)	transcription factor 3
eIF4E	eukaryotic translation initiation factor 4E
ERK	extracellular regulated MAP kinase
ETO (RUNX1T1)	viz RUNX1, translocated to, 1
EVI1	cotropic viral integration site 1
FAB	French-American-British cooperative group
FLT3	fms-related tyrosine kinase 3
G-CSF	colony stimulating factor 3 (granulocyte)
HOM-C	clustered homeotic genes
HOX geny	homeoboxové geny
HSC	hematopoietic stem cell
IGF-1R	insulin like growth factor 1 receptor
ITD	internal tandem duplications
MDS	myelodysplastický syndrom
MEIS1	myeloid ecotropic viral integration site 1
MLL	mixed lineage leukemia
MN1	meningioma 1
MYH11	myosin, heavy polypeptide 11
NK buňky	natural killers
NKX3.1	NK3 homeobox 1

NUP98	nucleoporin 98 kDa
p53	onkoprotein p53
PBX1	pre-B-cell leukemia homeobox 1
PC	polycomb
PIM1	pim-1 oncogene
PKC	protein kinase C
PML	promyelocytic leukemia
PRH/HEX	hematopoietically expressed homeobox
PTD	partial tandem duplications
qRT-PCR	quantitative real time PCR
RAR α	retinoic acid receptor α
SMAD4	SMAD family member 4
STAT	signal transducer, activator of transcription
TALE	tree amino acid loop extension
Tc	cytotoxic T lymphocyte
TEL (ETV6)	ets variant 6
TGF β	transforming growth factor β
Th	helper T lymphocyte
TPO	thrombopoietin
TRIB1	tribbles homolog 1
TRIB2	tribbles homolog 2
TRX	trithorax

Obsah

1. Úvod	9
2. Hematopoéza	11
3. Leukémie	13
3.1. Molekulární podstata vzniku leukémie	13
3.2. Rozdělení leukémií	14
3.2.1. Akutní leukémie	14
4. ALL v dětském věku	15
4.1. B prekurzorová ALL	16
4.2. T prekurzorová ALL	17
5. AML v dětském věku	17
6. Homeoboxové geny	19
6.1. Role HOX genů v normální hematopoéze	19
6.1.1. Příklady HOX genů v hematopoéze	20
6.2. Role HOX genů v patogenezi	22
6.2.1. Leukémie	22
6.2.2. Ostatní nehematologické malignity	24
7. HOXA9	25
7.1. HOXA9 v normální hematopoéze	25
7.2. Regulace HOXA9	26
7.3. HOXA9 v leukemogenezi	27
7.3.1. HOXA9 a MEIS1	27
7.3.2. NUP98-HOXA9	28
7.3.3. HOXA9 a MLL	29
7.4. HOXA9 a jím regulované geny a proteiny	29
7.5. HOXA9 a budoucí cíle léčby leukémie	31
8. Závěr	32
9. Seznam použité literatury	34

1. Úvod

Leukémie je nejčastější malignitou dětského věku. Od jejího objevení bylo diagnostikováno několik typů tohoto onemocnění, z nichž nejběžněji se vyskytujícím typem u dětí je akutní lymfoblastická leukémie (ALL), která tvoří 80% všech leukémií. Výrazně nižší výskyt je zaznamenán v případě akutní myeloidní leukémie (AML), která se podílí na celkových statistikách 15%. Myelodysplastický syndrom (MDS) pak tvoří 5% a chronická myeloidní leukémie (CML) 2-3%. Incidence leukémie je v naší populaci 5 nových případů na 100000 dětí ve věku 0-18 let. V praxi to znamená, že v České republice je ročně diagnostikováno přibližně 65 dětí s ALL, 12 dětí s AML, 3 děti s MDS a 1 dítě s CML (Klinika dětské hematologie a onkologie, UK 2. LF, 2011). Tato data se v průběhu posledních let téměř nemění. Pouze incidence ALL u předškolních dětí se během 90. let minulého století zvýšila na hodnotu podobnou státům západní Evropy. Na základě výše uvedených zjištění lze konstatovat, že incidence ALL pozitivně koreluje se socioekonomickou úrovní, a tudíž je vyšší v rozvinutějších oblastech (Hrusak et al 2002).

Pojem leukémie (v originále Leukämie) poprvé použil R. Virchov již v roce 1849. Od té doby bylo ve výzkumu leukémie učiněno mnoho významných objevů, které zásadním způsobem ovlivnily přístupy k tomuto onemocnění. Podle současného poznání příčin a mechanismů vedoucích ke vzniku leukémie hraje důležitou roli genová podstata tohoto onemocnění. Abnormality v genomu kmenových buněk a progenitorů hematopoézy, které vedou ke vzniku leukémie, mohou představovat nejen bodové mutace (výměna jedné báze) a chromozomální aberace, ale i numerické změny v počtu chromozomů. Tyto abnormality vznikají nejčastěji až v průběhu života jedince, pouze výjimečně mají dědičný základ. Tak jako pro ostatní nádory platí i pro leukémie vícečetná teorie vzniku, podle které s jednotlivými změnami genomu dostává preleukemická buňka selekční výhodu oproti buňkám normálním (Mayer, Starý et al 2002).

S ohledem na zmiňovanou teorii je prvořadým zájmem vědců studovat geny, u kterých by mutace, případně deregulace jejich exprese, byly významnými prvky tohoto vícečetného procesu. Mezi takové geny patří vysoce evolučně konzervovaná genová rodina homeoboxových (*HOX*) genů. *HOX* geny kódují transkripční faktory obsahující typickou 60 aminokyselinovou DNA vazebnou doménu (Grier et al 2005, review). Klíčovou úlohu mají *HOX* geny jak v regulaci pozice anterior-posteriorní osy těla obratlovců při vývoji embrya, tak i ve vývoji krevních buněk neboli hematopoéze (Morgan 1997). Pro správný

vývoj je důležité načasování exprese *HOX* genů, což je zajištěno tím, že geny na 3' konci jsou exprimovány dříve než geny 5' konci (Mallo et al 2010, review).

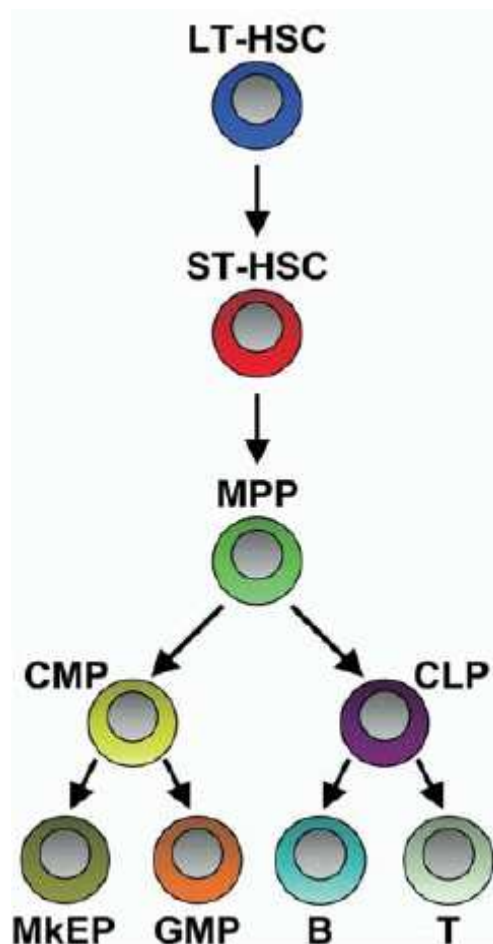
V této práci se zaměřuji na vliv *HOX* genů v hematopoéze a na jejich význam v samotném vývoji leukémie. Největší pozornost věnuji genu *HOXA9*, který patří do třídy I *HOX* genů, konkrétně do klastru A. *HOXA9* je jedním z nejvíce prozkoumaných genů ve skupině *HOX* a v souvislosti s vývojem leukémie i nejdůležitější. V mnoha studiích byla prokázána aberantní exprese *HOXA9* asociovaná s výskytem akutních leukémií. *HOXA9* byl v této souvislosti také nalezen v translokaci s nukleoporinem *NUP98* (nucleoporin 98 kDa) (Slape and Aplan 2004). Zvýšená exprese *HOXA9* byla detekována také u pacientů s CML, kde korelovala se špatnou prognózou tohoto onemocnění (Tedeschi et al 2010). Exprese *HOXA9* spolu s některými dalšími *HOX* geny byla spojena s prognózami rovněž u akutních leukémií. AML pacienti s dobrou cytogenetickou prognózou vykazovali nižší hladinu exprese vybraných *HOX* genů (Drabkin et al 2002). Naopak u dětských pacientů s ALL korelovala nízká exprese se zvýšeným výskytem relapsů (Starkova et al 2010). Samotný gen *HOXA9* byl označen nejvíce signifikantním markerem nepříznivé prognózy u pacientů s AML (Golub et al 1999). I když se tento gen stal pro řadu vědců předmětem zkoumání, jeho skutečná role v hematopoéze a vývoji leukémie není do dnešní doby zcela objasněna.

2. Hematopoéza

Hematopoéza neboli krvetvorba se stává z řady procesů vedoucích ke vzniku a zajištění neustálé obnovy krevních buněčných komponent. Na počátku krvetvorby stojí multipotentní hematopoetická kmenová buňka (HSC – hematopoietic stem cell), která je charakteristická expresí adhezivní molekuly CD34. HSC jsou lokalizovány v kostní dřeni a zde se v malém počtu udržují po celý život jedince. Část HSC se dle dosud všeobecně uznávaného dichotomického modelu, uváděného v učebnicích, diferencuje na společný myeloidní prekursor (CMP – common myeloid progenitor) a společný lymfoidní prekursor (CLP- common lymphoid progenitor), ze kterých se následně tvoří myeloidní a lymfoidní linie krevních buněk. Tyto progenitorové buňky již ztrácí schopnost sebeobnovy. Postupná diferenciací pak snižuje multipotentní potenciál buňky, tedy schopnost změny v jiný typ krevní buňky. Determinace diferenciací je zajištěna působením různých růstových faktorů (např. G-CSF stimuluje diferenciací granulocytů). Růstové faktory spouští aktivaci signálních drah, které ovlivňují expresi genů uvnitř buňky, což je důležité pro specifikaci každého konkrétního typu krevních buněk. Změnu diferenciací odráží změna exprese adhezivních molekul na povrchu buněk.

Z CMP se diferencují megakaryocyty, z jejichž cytoplazmatických fragmentů se tvoří trombocyty (krevní destičky), které se podílejí zejména na zástavě krvácení a srážení krve. Diferenciací CMP přes několik mezistádií vznikají také bezjaderné erytrocyty (červené krvinky), významné přenosem krevních plynů. Důležitými složkami nespecifické imunity, na jejichž vývojovém počátku též stojí CMP, jsou granulocyty (bazofily, neutrofil, eosinofily) a monocyty. Monocyty se ve tkáních dále vyvíjejí na makrofágy.

Diferenciací z CLP vznikají NK buňky (natural killers) a lymfocyty typu T a B. Vývoj B lymfocytů probíhá zpočátku v kostní dřeni a dokončuje se až po střetu s antigenem v sekundárních lymfoidních orgánech jako je slezina, uzliny nebo Peyerovy pláty. Plně diferencovaným B lymfocytem je plazmatická buňka produkující velké množství protilátek. T lymfocyty se vyvíjejí především v brzlíku (thymu). Tvoří několik subpopulací, mezi nimiž jsou nejznámější subpopulace pomocných T lymfocytů (Th) a cytotoxických T lymfocytů (Tc) (Hořejší et al 2009, Kindt et al 2007).



Obrázek 1: **Klasický dichotomický model hematopoézy** (Adolfsson et al 2005)

LT-HSC (dlouhodobá HSC), ST-HSC (krátkodobá HSC), MPP (multipotentní progenitor), CMP (společný myeloidní progenitor), CLP (společný lymfoidní progenitor), MkEP (megakaryocyt/erytroidní progenitor), GMP (granulocyt/makrofágový progenitor), B (B lymfocyt), T (T lymfocyt)

Zatímco se až doposud předpokládalo, že buňky ve stádiu CMP a CLP mají neodvolatelně danou budoucí diferenciaci na myeloidní a lymfoidní linie buněk (klasický dichotomický model), současná hypotéza předpokládá, že oba tyto prekursor mají jak myeloidní, tak lymfoidní potenciál. Bylo popsáno, že z T buněčného progenitoru v dospělém brzlíku mohou vzniknout jak lymfoidní, tak i myeloidní buňky, což je v rozporu s klasickým dichotomickým modelem. T buněčný progenitor sice ztratil schopnost tvorby B lymfocytu, ale zůstal mu zachován potenciál tvorby T lymfocytu a NK buněk, stejně jako myeloidní potenciál tvorby makrofágů (Wada et al 2008). Na základě mnoha studií, které popírají klasický dichotomický model hematopoézy, byla vytvořena řada dalších modelů, vyjádřených pomocí stromového diagramu (Katsura 2002, review; Lai and Kondo 2006; Ye and Graf 2007, review).

Všechny tyto modely se liší ve větvení stromových diagramů naznačujících děje hematopoézy a dokonce i ve vzájemných vztazích myeloidních a lymfoidních linií. Vzhledem k velké odlišnosti stromových modelů hematopoézy byl navržen alternativní model párových vztahů pro specifikaci vývoje buněk krvetvorby. V něm jsou naznačeny kontinuální vztahy mezi HSC, progenitory a výslednými diferencovanými buňkami, což pravděpodobně lépe vystihuje samotnou hematopoézu (Ceredig et al 2009, review).

3. Leukémie

3.1. Molekulární podstata vzniku leukémie

Většina genů podílejících se na vzniku leukémie patří mezi onkogeny a antionkogeny. Onkogeny, které se ve své původní nemutované formě nazývají protoonkogeny, odpovídají převážně za regulaci a stimulaci proliferace v normálních buňkách. V důsledku mutací protoonkogenů dochází k zesílení aktivity jejich produktů nebo ztrátě regulace fyziologickými regulátory, což vede ke zvýšené a nekontrolovatelné proliferaci buněk. Další možností aktivace protoonkogenů a vzniku onkogenů může být transpozice tohoto genu do transkripčně aktivní oblasti jiného genu, po které se tvoří větší množství genového produktu. Antionkogeny (nádorové supresory) mají opačný efekt. Tlumí proliferaci buněk. Některé z nich navíc stimulují buněčnou diferenciaci a apoptózu. Mutace v antionkogenech vyřadí jejich funkce, tím podpoří proliferaci buněk a zabrání jejich diferenciaci i apoptóze. Předpokládá se, že pro vznik leukémie jsou potřebné mutace jak v protoonkogenech, tak i v antionkogenech. Mutace dostatečně aktivující protoonkogeny je považována za mutaci dominantní, stačí pouze v jedné alele. Pro inaktivaci antionkogenů je však třeba mutace v obou alelách (tzv. recesivní mutace).

Pro leukemické buňky je typických několik znaků: ztráta schopnosti diferenciaci při zachované proliferaci, prodloužení doby života kvůli defektu apoptózy, nezávislost na vnějších růstových faktorech, defektní přenos buněčných signálů. Takto změněné nezralé a nefunkční leukemické buňky se hromadí, a vytěsňují tak zdravou populaci normálních krevních buněk (Mayer, Starý et al 2002).

3.2. Rozdělení leukémií

Leukémie se primárně dělí podle průběhu na akutní a chronické. Akutní leukémie jsou charakteristické svým prudkým nástupem často bez známé hematologické anamnézy. Neléčená nebo nedostatečně léčená akutní leukémie bývá pro pacienty fatální. Pro chronickou leukémii je typické rozdělení průběhu onemocnění do tří stádií: chronické fáze, akcelerace a blastické krize. Mezi chronické leukémie se řadí CML a chronické leukémie vycházející z lymfatické řady (Mayer, Starý et al 2002). Tato práce je zaměřena zejména na akutní leukémie, které se u dětí objevují nejčastěji.

3.2.1. Akutní leukémie

Akutní leukémie jsou heterogenní skupinou hematologických malignit, které se dělí na lymfoidní (ALL) a myeloidní (AML). Právě správné rozlišení mezi ALL a AML je důležité pro diagnostiku a následnou léčbu. Pro určení správné diagnózy je třeba morfologické, cytochemické, cytogenetické a imunologické vyšetření kostní dřeně a periferní krve. Hlavní kritéria pro jejich rozlišení jsou shrnuta v tabulce (Mayer, Starý et al 2002).

	ALL	AML
morfologie	žádná granula žádné Auerovy tyče	obvykle se mohou vyskytovat Auerovy tyče
imunofenotyp	B-řada: CD 19+, CD10+ T-řada: cyCD3+, CD7+	panmyeloidní antigeny CD13+, CD33+, CD65
karyotyp	t(8;14) (B-ALL) t(9;22) t(1;19) (pre- B-ALL) t(11;14) (T-ALL) t(4;11) (pro- B-ALL)	t(8;21) (FAB M2) t(15;17) (FAB M3) t(9;11) (FAB M5) inv(16) (FAB M4eo) monozomie 7 trizomie 8

Tabulka 1. Rozdílné znaky AML a ALL (Mayer, Starý et al 2002)

4. ALL v dětském věku

ALL, která tvoří 80% leukémii v dětském věku, patří mezi nejčastější nádorová onemocnění u dětí s vrcholem incidence mezi 2. a 5. rokem života. Prognóza takto nemocných dětí se v posledních letech zlepšila, protože více než 80% dětí s ALL je trvale vyléčeno zejména díky použití sjednocených léčebných protokolů (Pui et al 2008, review).

Doposud není zcela objasněna patogeneze vedoucí ke vzniku ALL, lze však konstatovat, že podle obecných předpokladů není toto onemocnění dědičné. Pouze méně než 5 % případů je asociováno s geneticky dědičnými poruchami jako je Downův syndrom, Bloomův syndrom, ataxia-telangiectasia nebo Nijmegen breakage syndrom. Vzhledem k velké heterogenitě ALL je velmi nepravděpodobná jedna společná příčina těchto onemocnění. Jediným doposud známým vnějším faktorem vyvolávajícím dětské leukémie je ionizující záření. Důkaz vlivu ionizujícího záření byl nalezen v epidemiologických datech po výbuchu atomových bomb v Japonsku po roce 1945. Zvýšený výskyt ALL je zaznamenán také u dětí, jejichž matky podstoupily v těhotenství rentgenové vyšetření (Greaves 2006, review).

Dnešní teorie vzniku ALL jsou založeny na několikastupňovém procesu, který na počátku (často ještě prenatálně) dává vznik klonům buněk s proliferační výhodou, nezpůsobujícím ještě samotné klinické onemocnění. Teprve následující změna leukemického klonu způsobí nekontrolovatelnou expanzi lymfoidních prekursorů a rozvoj ALL. Prvním zásahem vzniklým prenatálně bývají často genové zlomy a chromozomové translokace. Důkaz o správnosti této teorie dokládá studie o identických klonálních abnormalitách u monozygotních dvojčat s ALL. Tento jev je vysvětlen vznikem chromozomálního zlomu v buňce jednoho z dvojčat a následným přenosem druhému plodu (Greaves et al 2003). Také diagnostika metabolických vad těsně po porodu, využívající zaschlé kapky novorozenecké krve na Guthrieho kartičkách, potvrzuje teorii vzniku preleukemického klonu již před narozením (Wiemels et al 1999). Případná ALL je však diagnostikována o několik let později. Podle teorie opožděné infekce dochází k druhému zásahu opožděnou expozicí imunitního systému infekcím, která vede k neadekvátní imunitní reakci. Výsledkem této reakce může být u predisponovaných jedinců změna preleukemické buňky na buňku leukemickou (Greaves 2006, review). Druhý zásah nastává nejčastěji právě v období kolem 2. až 5. roku života, kdy se vyvíjí dětský imunitní systém. Data dokládající tento fakt pocházejí hlavně z rozvinutých zemí, kde v důsledku vyšší socioekonomické úrovně a sterilnějšího prostředí dochází u dítěte v předškolním období k menšímu styku s běžnými patogeny (Hrusak et al 2002).

4.1. B prekurzorová ALL

ALL, která vzniká z nezralých B prekurzorů, odpovídá 80% případů této nemoci. U většiny těchto ALL se vyskytují chromozomální klonální změny, zejména chromozomální translokace a v menší míře změny v počtu chromozomů. Takto pozměněný genotyp určuje patogenezi a prognózu pacienta (Mayer, Starý et al 2002).

Přibližně 25-30% dětských ALL tvoří vysoce hyperdiploidní leukémie (nad 50 chromozomů) patřící mezi nejpočetnější změny chromozomů. Nejčastější kopie jsou u chromozomů X, 4, 6, 8, 10, 14, 17, 18 a 21. Blasty se zvýšeným počtem chromozomů bývají citlivější k cytostatikům a vykazují zvýšenou apoptózu. U dětí je tato abnormalita spojena s velmi dobrou prognózou (Paulsson and Johansson 2009, review, Mayer, Starý et al 2002).

Translokace t(12;21)(p13;q22) s fúzním genem *TEL* (ETV6 – ets variant 6)/*AML1* (*RUNX1* – runt-related transcription factor) patří mezi nejčastější translokace u dětí s ALL. Objevuje se až ve 27% případů. Gen *TEL*, který leží na chromozomu 12, kóduje transkripční faktor z rodiny ETS. Gen *AML1* kóduje podjednotku, která váže DNA v transkripčním faktoru CBF (core binding factor). I když mechanismus transformace lymfoidních prekurzorů není dosud objasněn, děti s pozitivní *TEL/AML1* ALL mají příznivou prognózu (McLean et al 1996).

Fúzní gen *BCR* (breakpoint cluster region)/*ABL* (c-abl oncogen), nazývaný jako Ph chromozom, je produktem translokace t(9;22)(q34;q11). Výsledný protein kódovaný tímto fúzním genem vykazuje zvýšenou tyrosin-kinázovou aktivitu, která je zodpovědná za maligní transformaci. Ph chromozom je běžným charakteristickým znakem CML, ale vyskytuje se také zhruba ve 2-3% případů dětské ALL a u dospělých ALL až s frekvencí 20% (Reardon et al 1994). *BCR/ABL* pozitivní ALL patří mezi nejobtížněji léčitelné ALL dětského věku (Crist et al 1990).

Translokace t(1;19)(q23;p13) s fúzním genem *E2A/PBX1* (pre-B-cell leukemia transcription factor 1) spojuje transaktivační doménu genu *E2A* s genem *PBX1*, přesněji s jeho DNA vazebnou homeoboxovou doménou. *E2A/PBX1* jako chimérický transkripční faktor způsobuje leukemickou transformaci deregulací genů řízených *PBX1*, který není exprimován v normálních lymfoidních buňkách (Monica et al 1994).

Gen *MLL* (mixed lineage leukemia), který leží na dlouhém raménku chromozomu 11, se účastní translokací postihujících různé chromozomy zhruba u 8% dětských ALL. Mezi nejčastější translokace genu *MLL* patří t(4;11), t(9;11) a t(11;19). Zejména translokace

t(4;11)(q21,q23), jejímž produktem je fúzní gen *MLL/AF4*, vykazuje extrémně nepříznivou prognózu u dětí do jednoho roku života (Pui et al 2002).

4.2. T prekurzorová ALL

T-ALL asociovaná spíše s nepříznivou prognózou tvoří 10-15% případů dětské a až 25% dospělé ALL. Mezi časté genetické aberace u T-ALL patří různé translokace, nejčastější je mutace v genu *NOTCH1*. Vyskytuje se ve více než 50% případů. NOTCH1 je regulační membránový receptor, který hraje důležitou roli ve vývoji T lymfocytů. Samotný membránový receptor NOTCH1 se skládá z extracelulární a intracelulární části. Intracelulární část odštěpená pomocí enzymu γ -sekretázy po vazbě ligandu aktivuje transkripci v jádře. Inaktivace genu *NOTCH1* blokuje diferenciaci T lymfocytů, a tak se produkují pouze lymfocyty typu B. Naopak konstitutivně aktivovaná forma tohoto genu vyvolává tvorbu výhradně T lymfocytů (Ferrando 2009).

5. AML v dětském věku

AML je heterogenní skupinou onemocnění vyskytující se v 15–20% případů dětské akutní leukémie. French-American-British (FAB) pracovní skupina navrhla rozdělení AML na osm subtypů, které vycházejí z morfologických a cytochemických znaků. Jedná se o:

M0 – akutní leukémie s minimálními známkami myeloidní diferenciace (tzv. časná ML)

M1 – AML bez vyzrávání

M2 – AML s vyzráváním

M3 – akutní promyelocytární leukémie

M4 – akutní myelomonocytární leukémie

M5 – akutní monocytární leukémie

M6 – erytroleukémie

M7 – akutní megakaryoblastická leukémie (Mayer, Starý et al 2002, Manola 2009, review)

Pro dětskou AML jsou až v 85% případů typické chromozomální aberace, a to jak numerické (změny v počtu chromozomů), tak i strukturální (translokace, delece, inverze). Specifické chromozomální změny bývají spjaty s jednotlivými subtypy AML dle FAB.

Jednou z nejběžnějších aberací u dětské AML je translokace t(8;21)(q22;q22) produkující fúzní protein AML1/ETO (RUNX1T1 - runt-related transcription factor 1; translocated to, 1 (cyclin D-related)), který má funkci transkripčního faktoru. Tento fúzní protein inhibuje diferenciaci prekursorů myeloidní a erythroidní linie. Translokace *AML1/ETO*, která se vyskytuje v 7-16% případů, koreluje s M2 subtypem AML a bývá spojena s příznivou prognózou (Rulina et al 2010, review).

Abnormality 11q23 se zlomem v genu *MLL*, vyskytující se v 14-22% případů dětské AML, jsou nejčastěji asociovány se subtypy M4 a M5. Přestavby chromozomu 11q23 se obvykle spojují s nálezem translokace t(9;11), která má příznivější prognózu než ostatní translokace (t(10;11), t(6;11), t(11;19)). Přestavby tohoto chromozomu se také často vyskytují u sekundárních AML způsobených léčbou inhibitory topoizomerázy II (Manola 2009, review).

Inverze chromozomu 16 inv(16)(p13q22) produkuje fúzní gen *CBFβ* (core-binding factor β)/*MYH11* (myosin, heavy polypeptide 11, smooth muscle). Tento fúzní gen, detekovaný u leukémií s relativně dobrou prognózou, je nejčastěji spojován se subtypem M4 AML s abnormální eozinofílií, méně často pak se subtypy M0, M1, M2 a M5. Běžně se vyskytuje u 3-8% případů, ale vyšší incidenci (zhruba 11%) má v čínské populaci (Chan et al 2004).

Fúzní gen *PML* (promyelocytic leukemia)/*RARα* (retinoic acid receptor α) je abnormálním produktem translokace t(15;17)(q22;q12-22), a to nejčastěji u subtypu M3 AML (akutní promyelocytární leukémie - APL). Exprese *PML/RARα* v hematopoetických prekurzorech blokuje diferenciaci a podporuje jejich přežívání. S ohledem na tyto funkce se akumulují hematopoetické prekurzory v promyelocytárním stádiu, což koreluje s rysy APL (Ferrucci et al 1997).

U dětských AML (oproti dospělým AML) se již méně často vyskytuje normální karyotyp s různými prognózami. Mezi signifikantní diagnostické znaky této skupiny AML patří např. FLT3-ITD (internal tandem duplications) nebo MLL-PTD (partial tandem duplications). Fms-related tyrosin kinase 3 (FLT3), řazená do třídy III receptorových tyrosin kináz, je normálně exprimována v hematopoetických kmenových buňkách a časných progenitorech. FLT3-ITD se vyskytuje přibližně u 20% dětských AML (30% dospělých) a bývá spojována s nepříznivou prognózou. Nepříznivou prognózou se vyznačují rovněž MLL-PTD pozitivní AML a dětská AML s koduplikací FLT3-ITD a MLL-PTD (Shimada et al 2008).

6. Homeoboxové geny

Skupina *HOX* genů je vysoce konzervovanou genovou rodinou. Celkem 39 savčích *HOX* genů, které jsou uskupeny do čtyř klastrů (A, B, C a D) samostatně na čtyřech různých chromozomech (7, 17, 12 a 2), reprezentuje skupinu klastrovaných *HOX* genů (clustered *HOX* genes) třídy I homeoboxových genů. *HOX* geny mimo tyto klastry (non-clustered *HOX* genes) tvoří odlišnou a více početnou skupinu stovek genů (Argiropoulos and Humphries 2007, review). Tato skupina tvoří třídu II *HOX* genů a je rozptýlena po celém genomu. Obě třídy *HOX* genů kódují transkripční faktory, které obsahují DNA vazebný motiv o 60 aminokyselinách. DNA vazebný motiv tvoří strukturu helix-turn-helix (Grier et al 2005, review).

HOX geny jsou klíčovým faktorem v regulaci pozice anterior-posteriorní osy těla obratlovců při vývoji embrya. Během evoluce obratlovců se funkce genů rozšiřovala na regulaci pozdějších stádií vývoje, jako např. hematopoézu, vývoj genitálií (Morgan 1997).

Klastrované *HOX* geny (clustered *HOX* genes) lze dělit do 13 paralogních skupin, které mají vysoký stupeň homologie s homeotickými *HOM-C* geny (clustered homeotic genes) *Drosophily melanogaster* – Antennapedia (*ANT-C*) a Abdominal-B (*ABD-B*). Vysokou příbuznost vykazují paralogní skupiny 1 - 8 savčích *HOX* genů s *ANT-C*. Naopak paralogní skupiny 9 - 13 jsou blízce příbuzné s *ABD-B* (Grier et al 2005, review).

U *HOX* genů podílejících se na embryonálním vývoji je prokázána asociace mezi umístěním v klastrech a pořadím jejich exprese. Pro správný vývoj je důležité načasování exprese. Anteriorní geny jsou exprimovány dříve než geny posteriorní, což odpovídá jejich umístění - 3' geny jsou exprimovány dříve než 5' geny. Při vývoji embrya se exprese 3' genů postupně snižuje, a naopak exprese 5' genů se zvyšuje (Grier et al 2005, review, Mallo et al 2010, review).

6.1. Role *HOX* genů v normální hematopoéze

HOX geny mají kromě embryonálního vývoje zásadní význam rovněž v případě hematopoézy. Jsou exprimovány během proliferace a diferenciace HSC, přičemž jejich exprese se během vývoje krevních buněk snižuje. Vyšší exprese *HOX* genů lze najít u HSC, zatímco u diferencovaných krevních buněk je exprese výrazně nižší. Stejně jako u embryonálního vývoje souvisí exprese těchto genů s umístěním. S rostoucí expresí genů

ležících na 5' konci se snižuje exprese 3' genů (Sauvageau et al 1994, Argiropoulos and Humphries 2007, review).

Funkce *HOX* genů v normální hematopoéze byla zkoumána pomocí jejich zvýšené exprese z retrovirových vektorů nebo naopak snížení či vymizení exprese v knockoutovaných myších modelech. I přesto zůstává jejich role do značné míry nejasná. Zvýšená exprese *HOX* genů má významný vliv na blokování diferenciací lymfocytů, erytrocytů a tvorbu myeloproliferativních poruch (Argiropoulos and Humphries 2007, review).

Mezi regulátory *HOX* genů ovlivňující jejich expresi patří zejména produkt genu *MLL*, kofaktory PBX1 a MEIS 1 (myeloid ecotropic viral integration site 1). Produkt genu *MLL* vykazuje homologii s Trithorax geny (*TRX*) *Drosophily melanogaster*. Je modifikátorem chromatinu nutným pro správnou expresi *HOX* genů během vývoje. Hraje důležitou roli v navození proliferace a diferenciací HSC právě přes expresi *HOX* genů. Absence *MLL* genu snižuje schopnost tvorby hematopoetických kolonií, což může být vyváženo zvýšenou expresí genů *HOXA9*, *HOXA10*, *HOXB3* a *HOXB4* (Ernst et al 2004). Velký význam při udržování exprese *HOX* genů mají také geny s homologií k Polycomb genům (*PC*) *Drosophily melanogaster*, mezi které patří například *BM11* (polycomb ring finger oncogene). Na myších modelech bylo prokázáno antagonistické působení *TRX* a *PC* genů. *MLL* deficientní a *BM11* deficientní myši vykazovaly axiálně-kosterní transformace a deregulovanou expresi *HOX* genů, což bylo normalizováno delecí obou genů zároveň (Hanson et al 1999). Kofaktory *HOX* genů zvyšují jejich DNA vazebnou afinitu a specifitu vazby. Kofaktory jako jsou MEIS1 a PBX1 patří do TALE (tree amino acid loop extension) homeodoménových proteinů (Moens and Selleri 2006, review).

6.1.1. Příklady *HOX* genů v hematopoéze

V mnoha studiích byl prokázán důležitý účinek jednotlivých *HOX* genů v různých stádiích diferenciací hematopoetických buněk. Tento vliv byl pozorován na změněné expresi *HOX* genů, což se projevilo odchylkami v diferenciaci, proliferaci a sebeobnovování buněk krvetvorby.

Zvýšenou expresí genu *HOXA5* v kostní dřeni a pupečnickové krvi bylo dosaženo nejen expanze myeloidních prekurzorů, ale i redukce diferenciací erytrocytů. Díky studiím ovlivňujícím expresi *HOXA5* se předpokládá, že hlavní rolí *HOXA5* v lidské hematopoéze je regulace určování hematopoetické linie a jejího zrání. *HOXA5* pravděpodobně

v multipotentní progenitorové buňce odklání diferenciaci od cesty erytroidní k cestě myeloidní (Crooks et al 1999).

Pomocí retrovirové transdukce byla v myších hematopoetických buňkách zvýšena exprese HOXA10, což způsobilo značné odchylky v diferenciaci hematopoetických prekursorů v kostní dřeni. Tato změna měla podstatný vliv na myeloidní a B-lymfoidní diferenciaci a zvýšenou proliferaci progenitorů hematopoézy. Studií bylo rovněž prokázáno, že u podstatného množství zkoumaných myší se zvýšenou expresí HOXA10 byl zaznamenán vývoj AML s latentní fází 19-50 týdnů (Thorsteinsdottir et al 1997).

U myší postrádajících expresi genů *HOXB3* a *HOXB4* byly pozorovány defekty v hematopoéze zahrnující redukováný počet buněk v hematopoetických orgánech a snížený počet krvetvorných kmenových buněk. Diferenciace na specifické hematopoetické linie však nebyla ovlivněna (Bjornsson et al 2003). Zvýšená exprese HOXB3 v myší kostní dřeni vedla k poruchám lymfoidní i myeloidní linie krevních buněk. Odchylky v lymfoidní diferenciaci zahrnovaly vývoj B i T lymfocytů. Byla pozorována také zvýšená tvorba granulocytů a vzrůstající myeloproliferace způsobující myeloproliferativní poruchu (Sauvageau et al 1997). Transplantační studie zahrnující zvýšenou expresi genu *HOXB4* dokazují intenzivnější schopnost regenerace nejprimitivnějších hematopoetických kmenových buněk. HOXB4 je pravděpodobně pozitivním regulátorem sebeobnovy HSC, protože jeho zvýšená exprese nevede k rostoucímu počtu zralých buněk (Sauvageau et al 1995). Zvýšená exprese HOXB4 tedy indukuje expanzi HSC, aniž by docházelo ke vzniku leukémie. Předpokládá se, že molekulární podstata vlivu HOXB4 spočívá v přímé vazbě k DNA. Tento fakt byl prokázán tvorbou mutantů HOXB4 s chybnou DNA vazebnou funkcí, a to bez schopnosti zvýšení expanze HSC (Beslu et al 2004).

V další studii bylo dokázáno, že gen *HOXB6* v in vivo podmínkách pozitivně reguluje sebeobnovu a proliferaci HSC a myeloidních prekursorů, a naopak inhibuje hematopoézu erytrocytů a lymfocytů. Zesílená exprese HOXB6 v myší kostní dřeni způsobila zvýšenou schopnost proliferace časných hematopoetických prekursorů a snížení jejich schopnosti diferenciaci, která následně vedla ke vzniku AML s latentní fází trvající průměrně 223 dní. Pokud byl exprimován zároveň kofaktor MEIS1, doba nástupu AML se razantně snížila (Fischbach et al 2005).

Některé geny ze skupiny *HOXC* jsou exprimovány v lymfoidních buňkách. Geny *HOXC4* a *HOXC6* se exprimují během diferenciaci B a T lymfocytů, což prokázalo zkoumání exprese mRNA v různých stádiích jejich zrání. Zatímco *HOXC4* se transkribuje v kmenových buňkách, liniově nediferencovaných progenitorech a dále během maturace, *HOXC6* je

transkribován v časných lymfoidních buňkách s již určenou vývojovou linií a přetrvává během zrání. Oproti tomu *HOXC5*, jehož transkripty se nacházejí v neoplastických nádorových buněčných liniích a u buněk pacientů s non-Hodgkinským lymfomem, není transkribován v CD34+ buňkách kostní dřeně. Slabá exprese *HOXC5* se nachází u pre-B lymfocytů a thymocytů. Naopak konstitutivně je *HOXC5* exprimován až ve zralých buněčných liniích. Vzhledem k těmto faktům se předpokládá, že *HOXC5* se podílí na vzniku lymfomu (Bijl et al 1996).

6.2. Role HOX genů v patogenezi

Deregulovaná exprese *HOX* genů hraje roli při vývoji leukémie i jiných neoplastických změn. Zatím není jasné, které stádium maligní transformace *HOX* geny ovlivňují. Na základě dostupných informací lze předpokládat, že deregulace *HOX* genů přímo souvisí s procesem vzniku nádorové buňky, ale existuje i možnost, že je jejich efekt pouze vedlejší.

6.2.1. Leukémie

Produkt genu *MLL* je důležitým regulátorem exprese *HOX* genů. *MLL* gen fúzuje s více než 40 různými partnery a způsobuje různé hematologické malignity jako jsou akutní leukémie (AML i ALL) a myelodysplastický syndrom. Fúzní geny *MLL*, které deregulují expresi *HOX* genů, jsou jednou z příčin vzniku leukémií. *MLL* pozitivní B-ALL a T-ALL vykazují vyšší expresi některých *HOX* genů (*HOXA9*, *HOXA10*, *HOXC6*) a kofaktoru MEIS1. Tyto expresní studie *HOX* genů dokazují jejich dominantní vliv na leukemickou transformaci buněk u *MLL* představbových leukémií (Ferrando et al 2003). Bylo dokázáno, že produkt genu *MLL* reguluje expresi *HOX* genů přímou vazbou na jejich promotorové místo. *HOX* geny jako je *HOXA7* a *HOXA9*, jejichž exprese je během fyziologické hematopoetické diferenciaci snížena, jsou v leukemických buňkách konstantně exprimovány vlivem *MLL* fúzních proteinů. SET doména *MLL* proteinu má specifickou metyltransferázovou aktivitu, která aktivuje expresi *HOX* genů. *MLL* fúzní protein však nemá na metylaci histonů žádný vliv. Tento fakt naznačuje odlišnou regulaci exprese *HOX* genů u *MLL* a *MLL* fúzních proteinů (Milne et al 2002). Nejnovější studie ukazují, že transformace buněk v přítomnosti *MLL* fúzních genů vyžadují doménu CXXC, která se váže na nemetylované CpG oblasti, čímž zabráňuje metylaci DNA. Na základě této vazby byla prokázána zvýšená exprese *HOX* genů (Ayton et al 2004, Cierpicki et al 2010).

HOX geny jsou také často součástí specifických translokací spojovaných se vznikem leukémií. Fúzním partnerem *HOX* genů je *NUP98*, součást komplexu proteinů jaderného póru, který se účastní transportu proteinů a RNA mezi jádrem a cytoplazmou. Fúzní gen *NUP98-HOX* byl izolován z DNA pacientů s myeloidními leukémiemi (AML, CML). Mezi *HOX* geny účastníci se této fúze patří: *HOXA9*, *HOXA11*, *HOXA13*, *HOXC11*, *HOXC13* a *HOXD13*. Proteinový produkt *NUP98-HOX* se skládá z N-terminální části prezentující *NUP98* a C-terminální části proteinu *HOX*, který obsahuje neporušenou homeodoménovou část. Bylo dokázáno, že většina *HOX* genů ve fúzi s *NUP98* má leukemogenní potenciál. Mezi *HOX* geny však existují výjimky, jako je *HOXB4*, který se ve fúzi s *NUP98* pravděpodobně nepodílí na vzniku AML. Dále bylo prokázáno, že kofaktor *HOX* genů *MEIS1* snižuje dobu nástupu leukémie. Síla spolupráce *HOX* genů s kofaktorem tak koreluje s jejich leukemogenním potenciálem (Pineault et al 2004).

Kofaktor *MEIS1* zvyšuje transkripci receptorové tyrosin kinázy *FLT3* v *NUP98-HOX* pozitivních leukémiích. *FLT3* je důležitým prostředníkem spolupráce mezi *HOX* geny a jejich kofaktorem *MEIS1*. Bylo prokázáno, že exprese *FLT3* je indukována zvýšenou expresí *MEIS1* v *NUP98-HOX* preleukemických buňkách. Vysoká exprese *FLT3* tak spolupracuje s *NUP98-HOX* na vývoji agresivní AML (Palmqvist et al 2006).

Kvantitativní analýza exprese *HOX* genů může v budoucnu sloužit jako prognostický faktor a poskytovat nové informace využitelné při léčbě pacientů. Uplatnění se předpokládá zejména u případů s nejasnou prognózou, kde chybí charakteristické chromozomální změny. S použitím kvantitativní RT-PCR v reálném čase (qRT-PCR) byla zkoumána celková exprese *HOX* genů (*HOXA*, *HOXB*) u dospělých pacientů s chromozomálně definovanou AML se známou prognózou. Příznivá cytogenetická prognóza u těchto pacientů byla spojena s nízkou expresí *HOX* genů, zatímco případy se špatnou cytogenetickou prognózou vykazovaly vyšší míru exprese uvedených genů (Drabkin et al 2002). Podobná studie byla provedena u dětských pacientů s ALL. RNA exprese genů *HOXA*, *HOXB* a *CDX1/2* byla analyzována pomocí qRT-PCR. I v tomto případě byla prokázána korelace mezi hladinou exprese *HOX* genů a prognózou, avšak opačně než u AML. Úplné přežití bez relapsu (relapse free survival) bylo asociováno s vysokou hladinou *HOXA* genů, a naopak nízká hladina exprese těchto genů korelovala se zvýšeným výskytem relapsů (Starkova et al 2010).

6.2.2. Ostatní nehematologické malignity

Neoplastické změny sdílejí s normální embryogenezí mnoho regulačních drah, které jsou při vývoji nádoru často deregulovány. Nádorové bujení je pak pravděpodobně odchylkou od běžné organogeneze. Právě *HOX* geny představují složku spojující normální vývoj organismu a nádorové bujení. Do dnešní doby bylo nalezeno velké množství *HOX* genů, které jsou aberantně exprimovány u řady solidních nádorů. *HOX* geny způsobující neoplastické změny mohou patřit jak do skupiny nádorových supresorů, tak i mezi geny podněcující vznik nádoru (Samuel and Naora 2005, review).

HOX geny, které patří mezi nádorové supresory, mají v nádorech sníženou expresi, nebo se neexprimují vůbec. Naopak jejich exprese je trvale udržována ve zdravých diferencovaných tkáních. Mezi takové typy *HOX* genů patří např. *NKX3.1* (NK3 homeobox 1), který je exprimovaný v časném vývoji prostaty při embryogenezi u myší. Bylo však prokázáno, že jeho inaktivace zkoumaná v mutantních myších vede k epiteliální hyperplázii a dysplázii prostaty. Delece *NKX3.1* je pak pravděpodobně predispozicí pro vznik karcinomu prostaty (Bhatia-Gaur et al 1999). Dalším příkladem je gen *CDX2* (caudal type homeobox 2), který je běžně exprimován v buňkách střevního epitelu. Využitím polyklonálních protilátek bylo ukázáno, že exprese *CDX2* je snížena v pozdějších fázích lidského kolorektálního karcinomu (Ee et al 1995). Mezi další nádorové supresory patří gen *HOXA5*. Studie prokázala, že snížená exprese *HOXA5* koreluje s nedostatečnou expresí nádorového supresoru p53 v buněčných liniích i patientských vzorcích lidské rakoviny prsu. Jelikož byla v promotoru genu p53 nalezena *HOX* vazebná místa, lze předpokládat, že produkt genu *HOXA5* aktivuje transkripci p53 vazbou na jeho promotor (Raman et al 2000).

Geny podněcující vznik nádorů jsou naopak u neoplastických buněk exprimovány, a to buď zvýšeně oproti fyziologickému stavu, nebo je jejich exprese chybně reaktivována. Mezi takové geny patří například *HOXA1*, který se exprimuje pouze v nádorové prsní tkáni. Vynucená exprese tohoto genu v lidských buňkách karcinomu mléčné žlázy vykazovala zvýšení celkového počtu buněk podporou jejich přežívání díky zvýšené expresi negativního regulátoru apoptózy Bcl-2 (B-cell CLL/lymphoma 2) (Zhang et al 2003).

7. HOXA9

7.1. HOXA9 v normální hematopoéze

Gen *HOXA9*, lokalizovaný na chromozomu 7, je stejně jako většina ostatních *HOX* genů preferenčně exprimován v HSC a jeho exprese se během diferenciace postupně snižuje (Sauvageau et al 1994). Tudíž lze předpokládat, že nejdůležitější roli hraje *HOXA9* v regulaci vývoje časných HSC při normální hematopoéze.

Tento fakt byl také prokázán pomocí RT-PCR a Southern blottingu u normální lidské kostní dřeně. U CD34+ buněk byl *HOXA9* vysoce exprimován, zatímco u CD34- buněk byla exprese velmi slabá, nebo se vůbec neprojevovala. Vliv *HOXA9* byl zkoumán na homozygotních myších s přerušenou alelou v tomto genu. U *HOXA9*^{-/-} knockoutovaných myší byl prokázán snížený počet leukocytů (B a T lymfocytů, granulocytů) v periferní krvi a redukovaný počet již nasměrovaných myeloidních, erytroidních a B progenitorových buněk. V těchto pokusech nebyla prokázána anémie pravděpodobně z důvodu delší životnosti zralých červených krvinek. Ačkoli bylo ovlivněno několik krevních linií, což svědčí o defektu ve společné progenitorové buňce, nebylo zjištěno významné snížení počtu pluripotentních prekurzorů (Lawrence et al 1997). Zároveň bylo prokázáno, že *HOXA9*^{-/-} myší plody mají zásadní defekty ve vývoji brzlíku se sníženým počtem nezralých tymocytů, což dokazuje významný vliv *HOXA9* na vývoj časných stádií T- lymfocytů (Izon et al 1998).

Zvýšená exprese *HOXA9* v retrovirem transdukovaných myších buňkách se projevila vyšší schopností sebeobnovy, regenerace a expanze HSC. Zvýšená diferenciace myeloidní linie a zároveň suprimovaná diferenciace B-lymfoidní linie byla také prokázána jako důsledek zvýšené exprese *HOXA9* v myších buňkách (Thorsteinsdottir et al 2002).

Kromě klasického *HOXA9* proteinu v plné délce byla nalezena jeho izoforma *HOXA9T*, která postrádá důležitou homeoboxovou doménu. Obě tyto formy proteinu se nacházejí v organismu po celou dobu embryogeneze (u ptáků a savců). *HOXA9T* byl detekován u dospělých myší v ledvinách, kostní dřeni a slezině. Oproti *HOXA9* nevykazoval *HOXA9T* významné interakce s klasickými *HOX* kofaktory jako jsou MEIS a PBX. Avšak na acetyltransferázu histonů CBP se obě izoformy váží se stejnou afinitou, z čehož lze předpokládat jejich vzájemnou kompetici o tento protein (Dintilhac et al 2004).

7.2. Regulace HOXA9

Gen *HOXA9* je regulován na různých úrovních. Primárně probíhá regulace na transkripční úrovni, kde je určována míra exprese *HOXA9*. Sekundární regulace na proteinové úrovni pak modifikuje funkci transkripčních faktorů, konkrétně jejich DNA vazebnou schopnost.

Bylo prokázáno, že mezi regulátory exprese *HOXA9* patří transkripční faktor CDX4 (caudal type homeobox 4) a koregulátor menin, původně identifikovaný jako nádorový supresor kódovaný genem *MEN1*. Důležitá role v určování míry exprese *HOXA9* byla přiřazena modifikaci histonů, zejména metylaci histonu H3. Právě menin měl zásadní vliv na aktivaci a represi těchto modifikací. Výsledky této studie ukázaly funkční vazby mezi CDX4, meninem a histonovou modifikací na H3 podílející se na zachování transkripce 5'*HOX* genů (Yan et al 2006).

Dalším faktorem ovlivňujícím aktivitu *HOXA9* je SMAD4 (SMAD family member 4). Schopnost genu *HOXA9* a jeho chimérických fúzních forem maligně transformovat kostní dřeň byla snížena účinkem TGFβ/BMP (transforming growth factor β/bone morphogenetic protein). V této TGFβ/BMP signální dráze figuruje signální protein SMAD4 interagující s homeodoménou *HOXA9*. Vazba N-terminální části proteinu SMAD4 blokuje DNA vazebnou doménu *HOXA9*, čímž mu zabraňuje regulovat transkripci cílových genů. V patologických situacích je porušena rovnováha mezi SMAD a *HOXA9*, která způsobuje konstitutivní aktivaci *HOXA9* a může vést až ke vzniku leukémie (Wang et al 2006). V další studii byl prokázán významný vliv SMAD4 jako negativního regulátoru vzniku leukémie. U normálních HSC a progenitorových buněk se *HOXA9* v komplexu se SMAD4 hromadí v cytoplazmě. U *SMAD4* (-/-) buněk však není pozorována cytoplazmatická akumulace *HOXA9*, a naopak zvýšená hladina tohoto proteinu je detekována v jádře. Jako důsledek akumulace *HOXA9* v jádře roste schopnost imortalizace buněk in vitro. Ztráta SMAD4 in vivo urychlila vznik leukémie zvýšenou transformací HSC a progenitorových buněk (Quere et al 2011).

Proteinový produkt *HOXA9* je fosforylován na své homeodoménové části protein kinázou C (PKC) a kasein kinázou II. Fosforylace pak blokuje schopnost *HOXA9* vázat DNA a indukuje diferenciaci myeloidních buněk. Pomocí phorbol esteru, známého induktoru PKC, byla fosforylace posílena, zatímco specifický inhibitor PKC fosforylaci inhiboval (Vijapurkar et al 2004).

Trombopoetin (TPO), primární regulátor tvorby krevních destiček, byl označen jako další faktor ovlivňující funkci HOXA9 na posttranslační úrovni. Bylo prokázáno, že TPO indukuje jaderný transport HOXA9 v nezralých hematopoetických buňkách, což zvyšuje míru jaderné lokalizace tohoto proteinu. Regulace jaderného transportu je pravděpodobně způsobena zvýšenou tvorbou komplexů HOXA9-MEIS1. MEIS1 zřejmě blokuje jaderné exportní signály, což dovoluje jaderným lokalizačním signálům směřovat protein do jádra (Kirito et al 2004).

7.3. HOXA9 v leukemogenezi

Vzhledem k přítomnosti aberantní exprese HOXA9 je úloha tohoto genu v leukemogenezi nesporná. Změna exprese HOXA9 v leukemických buňkách je asociována s chromozomálními translokacemi zahrnujícími onkogen *MLL*, který je regulátorem HOXA9. Samotný *HOXA9* se účastní translokace s nukleoporinem *NUP98*. Důležitým kofaktorem HOXA9 účastnícím se maligní transformace buněk je MEIS1, který způsobuje zrychlení nástupu AML.

7.3.1. HOXA9 a MEIS1

Vzhledem k tomu, že již ve starších studiích byla popsána spolupráce HOXA9 s kofaktorem MEIS1 na maligní transformaci myší kostní dřeně, podnětem pro další výzkum bylo pochopení molekulární podstaty tohoto děje (Kroon et al 1998). Bylo prokázáno, že MEIS1, který je důležitý pro přežití leukemických buněk, by mohl aktivovat receptory FLT3 tyrozin kinázy hrající důležitou roli v myeloidní transformaci buněk (Wang et al 2005). Následně se však ukázalo, že tyrosin kináza FLT3 je pro HOXA9/MEIS1 leukemogenezi postradatelná. Tento fakt vychází z pokusů s genotypy *FLT3*^{-/-} a *FLT3*^{+/+} *HOXA9/MEIS1* myších dřeňových progenitorových buněk, kdy se u obou genotypů projevil stejný transformační potenciál (Morgado et al 2007). Protože zvýšená exprese MEIS1 vyústila v masivní apoptózu, bylo následně prokázáno, že kofaktor MEIS1 zprostředkovává apoptózu závislou na kaspázách. Koexprese HOXA9 a MEIS1 potlačila MEIS1 indukovanou apoptózu a způsobila ochranu proti apoptotickým induktorům. Tato rezistence proti apoptotickým stimulům dává HOXA9/MEIS1 buňkám selektivní výhodu a může vést až k leukemogenezi (Wermuth and Buchberg 2005). MEIS1 a HOXA9 pravděpodobně spolupracuje s proteinovými produkty TRIB1 (tribbles homolog 1) a EVI1 (ecotropic viral integration site 1) na myeloidní proliferaci a urychlení vzniku AML. Navíc TRIB1 a EVI1 samy o sobě

podporují růstový potenciál myeloidních progenitorových buněk. Zde se také ukázalo, že TRIB1 je myeloidním onkogenem. Zvyšuje totiž fosforylaci ERK (extracellular regulated MAP kinase) dráhy, čímž dochází k inhibici apoptózy (Jin et al 2007). Dále bylo prokázáno, že také TRIB2 (tribbles homolog 2) spolupracuje s HOXA9 na urychlení vzniku AML (Keeshan et al 2008).

7.3.2. NUP98-HOXA9

Produkt translokace t(7;11)(p15;p15) NUP98-HOXA9 je protein typický pro AML a MDS. Tento aberantní transkripční faktor obsahuje N-terminální doménu prezentovanou nukleoporinem NUP98, která je spojená s homeodoménovou C-terminální částí HOXA9 vážící DNA. V rámci komplexu jaderného póru tvoří NUP98 díky opakovanému FG motivu dokovací místo s potenciálem přepravy proteinů a RNA přes jadernou membránu (Slape and Aplan 2004). Bylo prokázáno, že produkt fúzního genu *NUP98-HOXA9* způsobuje dlouhodobou proliferaci, a naopak inhibuje diferenciaci CD34+ lidských hematopoetických buněk. Nebylo však jasné, zda jsou tyto účinky spojené s funkcí homeoboxové domény (Takeda et al 2006). V další studii byl prokázán fakt, že přerušení diferenciaci lidských CD34+ buněk narušením genové exprese nevyžaduje vazbu homeoboxové domény proteinu HOXA9 k DNA. NUP98-HOXA9 tudíž pravděpodobně ovlivňuje buněčnou transformaci dvěma odlišnými mechanismy, a to jak přímou transkripční aktivací pomocí homeoboxové domény, tak i vlivem NUP98 bez přímé vazby DNA (Yassin et al 2009).

Leukemogenní potenciál NUP98-HOXA9 byl hodnocen na retrovirově transdukovaných transplantovaných myších buňkách. Takto transplantované myši podlely myeloproliferativnímu onemocnění s přechodem do AML. Fúzní protein NUP98-HOXA9 byl označen jako protein zodpovědný za němou preleukemickou fázi myeloproliferativního onemocnění. Společná exprese NUP98-HOXA9 a MEIS1 vedla k urychlení přechodu myeloproliferativního onemocnění do AML (Kroon et al 2001).

Translokace t(7;11)(p15;p15) byla prokázána také u CML. Předpokládá se, že fúzní protein NUP98-HOXA9 by mohl hrát důležitou roli ve vývoji blastické krize tohoto onemocnění. Transformace do blastické krize CML je charakterizována ztrátou diferenciaci myeloidních prekurzorů, za což může být odpovědný právě fúzní protein NUP98-HOXA9 (Yamamoto et al 2000).

7.3.3. HOXA9 a MLL

MLL přestavbové leukémie, u nichž bývá detekována zvýšená hladina exprese *HOX* genů zahrnujících i *HOXA9*, patří mezi leukémie se špatnou prognózou. Bylo prokázáno, že produkt genu *MLL* (CXXC doména) váže specifické CpG ostrůvky na *HOXA9* a následně pozitivně reguluje expresi mnoha transkriptů. Přítomnost MLL na těchto místech zabraňuje metylaci DNA. Tato regulace může být projevem epigenetické dědičnosti. MLL fúzní proteiny oproti fyziologicky exprimovaným MLL proteinům chrání před metylací pouze část oblastí, což by mohlo být rozhodující pro přepis *HOXA9* u MLL přestavbových leukémií (Erfurth et al 2008). Aberantně exprimované MLL fúzní proteiny pak pravděpodobně udržují expresi *HOXA9* i v pozdějších stádiích vývoje krevních buněk.

Bylo prokázáno, že myeloidní transformace *MLL* onkogenu je spojena se zvýšenou expresí specifické podmnožiny *HOXA* genů, konkrétně s *HOXA7* a *HOXA9*. Gen *HOXA9* byl označen jako nezbytný pro indukci tvorby MLL asociovaných myeloidních leukémií v počátečních fázích onemocnění (Ayton and Cleary 2003).

Expresí genu *HOXA9* se zdá být nezbytná pro růst a udržení klonů lidských MLL přestavbových leukémií. Nedostatek exprese *HOXA9* vedl ke snížení proliferační kapacity, diferenciaci a k indukci apoptózy, což bylo způsobeno původní zvýšenou expresí *HOXA9*. Potlačení exprese *HOXA9* způsobilo také snížení exprese spolupracujících genů jako jsou 5'*HOXA* geny nebo kofaktory MEIS a PBX1 (Faber et al 2009).

7.4. HOXA9 a jím regulované geny a proteiny

Proteinový produkt genu *HOXA9* je transkripčním faktorem. Reguluje tudíž transkripci několika genů vazbou na promotor. *HOXA9* ale reguluje přímo také proteinové produkty jako je eukaryotní iniciační faktor translace.

Gen *CYBB* (cytochrome b-245, beta polypeptid) kódující protein gp91-Phox je přepisován v diferencovaných myeloidních buňkách. V nediferencovaných buňkách je tato exprese potlačena produktem genu *HOXA10*. Fosforylace tyrozinových zbytků na *HOXA10* během myelopoézy snižuje schopnost vazby *HOXA10* do promotoru *CYBB*, a tím také jeho vliv na transkripci *CYBB*. Oproti tomu produkt genu *HOXA9* působící vazbou na promotor *CYBB* v diferencovaných buňkách aktivuje expresi tohoto genu. Navíc fosforylace tyrozinů na *HOXA9* zvyšuje jeho vazebnou afinitu na promotor *CYBB*. Současně bylo zjištěno, že pro zprostředkování této regulace exprese je vyžadován PBX1. Naopak MEIS1 zde působí jako negativní regulátor. Studován zde byl také vliv fúzního proteinu NUP98-*HOXA9*, který

blokuje transkripci *CYBB*. Během této studie byly nalezeny významné rozdíly ve vazbě NUP98-HOXA9 a HOXA9 na promotor. U NUP98-HOXA9 nebylo prokázáno ovlivnění vazby fosforylací. Nejdůležitějším vlivem způsobujícím blok diferenciace myeloidních buněk během leukemogeneze je pravděpodobně NUP98-HOXA9 a MEIS1, které jasně potlačují expresi *CYBB* (Bei et al 2005).

Koexprese HOXA9 a MN1 (meningioma 1) byla spojena s aktivací cílových genů *STAT* (signal transducer and activator of transcription) u nejagresivnější skupiny AML. V této studii bylo prokázáno, že *STAT* signalizace je rozhodující pro sebeobnovu leukemických kmenových buněk, které koexprimují HOXA9 a MN1 (Heuser et al 2009).

Dále bylo prokázáno, že produkt genu *HOXA9* reguluje transkripci onkogenní kinázy *PIM1* (pim-1 oncogene) přímou vazbou na její promotor. Tím způsobuje expresi *PIM1* v buňkách krvetvorby. Exprese proteinu *PIM1* zvýšila fosforylaci a inaktivaci proapoptotického proteinu *BAD* (BCL2-associated agonist of cell death). Lze tedy předpokládat, že *PIM1* je zprostředkovatelem antiapoptotických účinků *HOXA9* (Hu et al 2007).

Jako nutný, nikoli postačující cíl *HOXA9/MEIS1* leukemické transformace, byl označen transkripční faktor *c-Myb* (v-myb myeloblastosis viral oncogene homolog) (Hess et al 2006). Stimulace exprese *HOXA9* vedla ke zvýšení exprese transkripčního faktoru *c-Myb* a indukci povrchové exprese receptoru *IGF-1R* (insulin like growth factor 1 receptor). Zvýšená exprese *HOXA9* vyvolala indukci exprese *IGF-1R* v B-buněčných liniích ALL. Naopak umlčení projevu *HOXA9* pomocí siRNA zabránilo expresi *IGF-1R*. Z těchto faktů vyplývá, že *HOXA9* pozitivně reguluje expresi *IGF-1R*, a tím podporuje růst leukemických buněk (Whelan et al 2008).

Proteinem, který je regulován produktem genu *HOXA9*, byl označen eukaryotní iniciační faktor translace (eIF4E). eIF4E reguluje genovou expresi jak v cytoplazmě v limitujícím kroku iniciace translace, tak i v jádře, kde usnadňuje export části mRNA. Deregulace obou těchto funkcí eIF4E může přispět k nádorové transformaci buňky. Již v dřívějších studiích byl podán důkaz o tom, že zvýšená exprese eIF4E přispívá k leukemogenezi blokováním granulocytární a monocytární diferenciace (Topisirovic et al 2003). Dále bylo prokázáno, že *HOXA9* je pozitivním regulátorem cytoplazmatické i jaderné funkce eIF4E. Jako faktor působící represivně na eIF4E byl označen *PRH/HEX* (hematopoietically expressed homeobox). Tento konkurenční mechanismus regulace eIF4E je narušen u skupiny leukémií, kde *HOXA9* vytlačuje *PRH*, což přispívá k deregulaci eIF4E (Topisirovic et al 2005).

7.5. HOXA9 a budoucí cíle léčby leukémie

Vzhledem k mnoha studiím popisujícím vliv HOXA9 na leukemickou transformaci buněk, lze tento gen označit za potenciální cíl léčby leukémií. Zejména u MLL přestavbových leukémií se předpokládá budoucí směřování léčby právě na gen *HOXA9* (Faber et al 2009). Dalšími cíly budoucí terapie mohou být také regulátory HOXA9 jako SMAD4 (Quere et al 2011) nebo přímo modulování fosforylace proteinového produktu HOXA9 (Vijapurkar et al 2004).

8. Závěr

HOXA9 je nejčastěji zkoumaným *HOX* genem. Role *HOXA9* v leukemogenezi byla potvrzena mnoha studiemi a i nadále zůstává tento gen předmětem dalšího výzkumu. Gen *HOXA9* je klíčový regulátor vývoje HSC v normální hematopoéze. Fyziologicky se však jeho exprese s vývojem krevních buněk snižuje. Zvýšená exprese *HOXA9* byla detekována u *MLL* asociovaných myeloidních leukémií. Předpokládá se, že *HOXA9* je nezbytný pro indukci tvorby tohoto typu leukémií v počátečních fázích onemocnění (Ayton and Cleary 2003). Bylo prokázáno, že produkt genu *MLL* reguluje transkripci *HOXA9* přímou vazbou, čímž zabraňuje metylaci a udržuje tak expresi tohoto genu (Erfurth et al 2008). Samotný *HOXA9* se účastní translokace s *NUP98*, přičemž fúzní protein *NUP98-HOXA9* je detekován u AML a MDS (Slape and Aplan 2004). Tento fúzní protein podporuje proliferaci a inhibuje diferenciaci lidských CD34+ buněk (Takeda et al 2006). *NUP98-HOXA9* byl označen jako protein odpovědný za něhou preleukemickou fází myeloproliferativního onemocnění, přičemž společná exprese s *MEIS1* vedla k urychlení nástupu AML (Kroon et al 2001). *NUP98* ve fúzi s *HOXA9* se pravděpodobně účastní také vývoje blastické krize u CML (Yamamoto et al 2000).

Zajímavá studie na myších modelech prokázala odlišný vliv zvýšené exprese *HOXA9* na myeloidní a lymfoidní linie buněk. Zatímco u myeloidní linie vedla zvýšená exprese *HOXA9* k AML, u T a B lymfoidní linie se lymfoidní malignita nevyvinula (Thorsteinsdottir et al 2002). Tento fakt má pravděpodobně souvislost se studiemi na patientských vzorcích AML i ALL. U dospělých pacientů s AML byla nepříznivá prognóza spojena s vysokou expresí *HOX* genů včetně *HOXA9* (Drabkin et al 2002). Naopak u dětských pacientů s ALL byla vysoká exprese *HOX* genů zahrnující *HOXA9* asociována s vysokou hladinou přežití bez relapsu (Starkova et al 2010). Lze tedy konstatovat, že gen *HOXA9* působí zcela rozdílně na myeloidní a lymfoidní linie jak na myších modelech, tak u pacientů trpících leukémií. Je pravděpodobné, že pro vznik lymfoidních malignit je třeba kromě zvýšené exprese *HOXA9* ještě další dosud nepopsaný zásah.

Ačkoli je *HOXA9* označován za nejlépe prozkoumaný *HOX* gen, stále není jeho role v leukemogenezi zcela objasněna. Komplikací ve výzkumu *HOXA9* je řada nedostatečně prostudovaných regulačních drah, jejichž součástí je právě tento gen. Bylo prokázáno několik faktorů ovlivňujících transkripci i samotnou funkci *HOXA9*, stejně jako mnoho genů a

proteinů, které jsou regulovány proteinovým produktem HOXA9. Lze však předpokládat, že na svůj objev čeká ještě řada genů, které jsou s HOXA9 v interakci.

Od doby první diagnózy leukémie z kostní dřeně nemocného, zavedení radioterapie do léčby leukémií nebo prvního podání chemoterapie (nitrogen mustard) uplynulo mnoho let (Mayer, Starý et al 2002). Dodnes však zůstává řada nezodpovězených otázek týkajících se jak vzniku leukémie, tak její diagnózy a inovace v terapii. Důležitým předmětem zájmu bude v budoucnu pravděpodobně HOXA9, a to zejména v souvislosti s možným zacílením leukemické terapie. Všeobecně existují dva přístupy cílené terapie: přímé a nepřímé ovlivnění zkoumaného genu. Při nepřímém ovlivnění by bylo možné působit na regulační dráhy, např. prostřednictvím SMAD4, který blokuje DNA vazebnou doménu HOXA9, čímž mu zabraňuje regulovat transkripci cílových genů (Quere et al 2011). Modifikace epigenetických regulací, jako je fosforylace a metylace, je další možností nepřímého ovlivnění HOXA9. Zatímco fosforylace blokuje schopnost HOXA9 vázat (Vijapurkar et al 2004), metylace umlčuje jeho expresi. Regulace genu *HOXA9* by mohla potenciálně zvrátit maligní transformaci hematopoetických buněk, a tudíž by mohla být využita v budoucnosti k léčbě leukémií.

9. Seznam použité literatury:

- Adolfsson J, Mansson R, Buza-Vidas N, Hultquist A, Liuba K, Jensen CT *et al* (2005). Identification of Flt3(+) lympho-myeloid stem cells lacking erythro-megakaryocytic potential: A revised road map for adult blood lineage commitment. *Cell* **121**: 295-306.
- Argiropoulos B, Humphries RK (2007). Hox genes in hematopoiesis and leukemogenesis. *Oncogene* **26**: 6766-6776.
- Ayton PM, Cleary ML (2003). Transformation of myeloid progenitors by MLL oncoproteins is dependent on Hoxa7 and Hoxa9. *Genes & Development* **17**: 2298-2307.
- Ayton PM, Chen EH, Cleary ML (2004). Binding to nonmethylated CpG DNA is essential for target recognition, transactivation, and myeloid transformation by an MLL oncoprotein. *Molecular and Cellular Biology* **24**: 10470-10478.
- Bei L, Lu YF, Eklund EA (2005). HOXA9 activates transcription of the gene encoding gp91(Phox) during myeloid differentiation. *Journal of Biological Chemistry* **280**: 12359-12370.
- Beslu N, Kros J, Laurin M, Mayotte N, Humphries KR, Sauvageau G (2004). Molecular interactions involved in HOXB4-induced activation of HSC self-renewal. *Blood* **104**: 2307-2314.
- Bhatia-Gaur R, Donjacour AA, Sciavolino PJ, Kim M, Desai N, Young P *et al* (1999). Roles for Nkx3.1 in prostate development and cancer. *Genes & Development* **13**: 966-977.
- Bijl J, vanOostveen JW, Kreike M, Rieger E, vanderRaaij-Helmer LMH, Walboomers JMM *et al* (1996). Expression of HOXC4, HOXC5, and HOXC6 in human lymphoid cell lines, leukemias, and benign and malignant lymphoid tissue. *Blood* **87**: 1737-1745.
- Bjornsson JM, Larsson N, Brun ACM, Magnusson M, Andersson E, Lundstrom P *et al* (2003). Reduced proliferative capacity of hematopoietic stem cells deficient in hoxb3 and hoxb4. *Molecular and Cellular Biology* **23**: 3872-3883.
- Ceredig R, Rolink AG, Brown G (2009). Models of haematopoiesis: seeing the wood for the trees. *Nature Reviews Immunology* **9**: 293-300.
- Cierpicki T, Risner LE, Grembecka J, Lukasik SM, Popovic R, Omonkowska M *et al* (2010). Structure of the MLL CXXC domain-DNA complex and its functional role in MLL-AF9 leukemia. *Nature Structural & Molecular Biology* **17**: 62-U82.
- Crist W, Carroll A, Shuster J, Jackson J, Head D, Borowitz M *et al* (1990). Philadelphia chromosome positive childhood acute lymphoblastic leukemia: clinical and cytogenetic characteristics and treatment outcome. A Pediatric Oncology Group study. *Blood* **76**: 489-494.
- Crooks GM, Fuller J, Petersen D, Izadi P, Malik P, Pattengale PK *et al* (1999). Constitutive HOXA5 expression inhibits erythropoiesis and increases myelopoiesis from human hematopoietic progenitors. *Blood* **94**: 519-528.
- Dintilhac A, Bihan R, Guerrier D, Deschamps S, Pellerin I (2004). A conserved non-homeodomain Hoxa9 isoform interacting with CBP is co-expressed with the 'typical' Hoxa9 protein during embryogenesis. *Gene Expression Patterns* **4**: 215-222.
- Drabkin H, Parsy C, Ferguson K, Guilhot F, Lacotte L, Roy L *et al* (2002). Quantitative HOX expression in chromosomally defined subsets of acute myelogenous leukemia. *Leukemia* **16**: 186-195.

- Ee HC, Erler T, Bhathal PS, Young GP, James RJ (1995). Cdx-2 homeodomain protein expression in human and rat colorectal adenoma and carcinoma. *American Journal of Pathology* **147**: 586-592.
- Erfurth FE, Popovic R, Grembecka J, Cierpicki T, Theisler C, Xia ZB *et al* (2008). MLL protects CpG clusters from methylation within the Hoxa9 gene, maintaining transcript expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**: 7517-7522.
- Ernst P, Mabon M, Davidson AJ, Zon LI, Korsmeyer SJ (2004). An MII-dependent Hox program drives hematopoietic progenitor expansion. *Current Biology* **14**: 2063-2069.
- Faber J, Krivtsov AV, Stubbs MC, Wright R, Davis TN, van den Heuvel-Eibrink M *et al* (2009). HOXA9 is required for survival in human MLL-rearranged acute leukemias. *Blood* **113**: 2375-2385.
- Ferrando AA (2009). The role of NOTCH1 signaling in T-ALL. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*: United States. pp 353-361.
- Ferrando AA, Armstrong SA, Neuberg DS, Sallan SE, Silverman LB, Korsmeyer SJ *et al* (2003). Gene expression signatures in MLL-rearranged T-lineage and B-precursor acute leukemias: dominance of HOX dysregulation. *Blood* **102**: 262-268.
- Ferrucci PF, Grignani F, Pearson M, Fagioli M, Nicoletti I, Pelicci PG (1997). Cell death induction by the acute promyelocytic leukemia-specific PML/RAR alpha fusion protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**: 10901-10906.
- Fischbach NA, Rozenfeld S, Shen W, Fong S, Chrobak D, Ginzinger D *et al* (2005). HOXB6 overexpression in murine bone marrow immortalizes a myelomonocytic precursor in vitro and causes hematopoietic stem cell expansion and acute myeloid leukemia in vivo. *Blood* **105**: 1456-1466.
- Golub TR, Slonim DK, Tamayo P, Huard C, Gaasenbeek M, Mesirov JP *et al* (1999). Molecular classification of cancer: Class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science* **286**: 531-537.
- Greaves M (2006). Infection, immune responses and the aetiology of childhood leukaemia. *Nature Reviews Cancer* **6**: 193-203.
- Greaves MF, Maia AT, Wiemels JL, Ford AM (2003). Leukemia in twins: lessons in natural history. *Blood* **102**: 2321-2333.
- Grier DG, Thompson A, Kwasniewska A, McGonigle GJ, Halliday HL, Lappin TR (2005). The pathophysiology of HOX genes and their role in cancer. *Journal of Pathology* **205**: 154-171.
- Hanson RD, Hess JL, Yu BD, Ernst P, van Lohuizen M, Berns A *et al* (1999). Mammalian Trithorax and Polycomb-group homologues are antagonistic regulators of homeotic development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**: 14372-14377.
- Hess JL, Bittner CB, Zeisig DT, Bach C, Fuchs U, Borkhardt A *et al* (2006). c-Myb is an essential downstream target for homeobox-mediated transformation of hematopoietic cells. *Blood* **108**: 297-304.
- Heuser M, Sly LM, Argiropoulos B, Kuchenbauer F, Lai C, Weng A *et al* (2009). Modeling the functional heterogeneity of leukemia stem cells: role of STAT5 in leukemia stem cell self-renewal. *Blood* **114**: 3983-3993.

Hořejší V, Bartůňková J (2009). *Základy imunologie*. Vyd. 4. Praha: Nakladatelství TRITON, 2009. 316 s.

Hrusak O, Trka J, Zuna J, Polouckova A, Kalina T, Stary J *et al* (2002). Acute lymphoblastic leukemia incidence during socioeconomic transition: selective increase in children from 1 to 4 years. *Leukemia* **16**: 720-725.

Hu YL, Passegue E, Fong S, Largman C, Lawrence HJ (2007). Evidence that the Pim1 kinase gene is a direct target of HOXA9. *Blood* **109**: 4732-4738.

Chan NPH, Wong WS, Ng MLH, Tsang KS, Lau TT, Leung Y *et al* (2004). Childhood acute myeloid leukemia with CBF beta-MYH11 rearrangement: Study of incidence, morphology, cytogenetics, and clinical outcomes of Chinese in Hong Kong. *American Journal of Hematology* **76**: 300-303.

Izon DJ, Rozenfeld S, Fong ST, Komuves L, Largman C, Lawrence HJ (1998). Loss of function of the homeobox gene Hoxa-9 perturbs early T-cell development and induces apoptosis in primitive thymocytes. *Blood* **92**: 383-393.

Jin GA, Yamazaki Y, Takuwa M, Takahara T, Kaneko K, Kuwata T *et al* (2007). Trib1 and Evi1 cooperate with Hoxa and Meis1 in myeloid leukemogenesis. *Blood* **109**: 3998-4005.

Katsura Y (2002). Redefinition of lymphoid progenitors. *Nature Reviews Immunology* **2**: 127-132.

Keeshan K, Shestova O, Ussin L, Pear WS (2008). Tribbles homolog 2 (Trib2) and HoxA9 cooperate to accelerate acute myelogenous leukemia. *Blood Cells Molecules and Diseases* **40**: 119-121.

Kindt TJ, Goldsby RA, Osborne, BA (2007). *Kuby Immunology*. 6th ed. New York: W. H. Freeman and Company, 2007. 574 s.

Kirito K, Fox N, Kaushansky K (2004). Thrombopoietin induces HOXA9 nuclear transport in immature hematopoietic cells: Potential mechanism by which the hormone favorably affects hematopoietic stem cells. *Molecular and Cellular Biology* **24**: 6751-6762.

Kroon E, Kros J, Thorsteinsdottir U, Baban S, Buchberg AM, Sauvageau G (1998). Hoxa9 transforms primary bone marrow cells through specific collaboration with Meis1a but not Pbx1b. *Embo Journal* **17**: 3714-3725.

Kroon E, Thorsteinsdottir U, Mayotte N, Nakamura T, Sauvageau G (2001). NUP98-HOXA9 expression in hemopoietic stem cells induces chronic and acute myeloid leukemias in mice. *Embo Journal* **20**: 350-361.

Lai AY, Kondo M (2006). Asymmetrical lymphoid and myeloid lineage commitment in multipotent hematopoietic progenitors. *Journal of Experimental Medicine* **203**: 1867-1873.

Lawrence HJ, Helgason CD, Sauvageau G, Fong S, Izon DJ, Humphries RK *et al* (1997). Mice bearing a targeted interruption of the homeobox gene HOXA9 have defects in myeloid, erythroid, and lymphoid hematopoiesis. *Blood* **89**: 1922-1930.

Mallo M, Wellik DM, Deschamps J (2010). Hox genes and regional patterning of the vertebrate body plan. *Developmental Biology* **344**: 7-15.

Manola KN (2009). Cytogenetics of pediatric acute myeloid leukemia. *European Journal of Haematology* **83**: 391-405.

- Mayer J, Starý J *et al* (2002). Leukemie. Vyd. 1. Praha: Grada Publishing, spol. s r. o., 2002. 357 s.
- McLean TW, Ringold S, Neuberg D, Stegmaier K, Tantravahi R, Ritz J *et al* (1996). TEL/AML-1 dimerizes and is associated with a favorable outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* **88**: 4252-4258.
- Milne TA, Briggs SD, Brock HW, Martin ME, Gibbs D, Allis CD *et al* (2002). MLL targets SET domain methyltransferase activity to Hox gene promoters. *Molecular Cell* **10**: 1107-1117.
- Moens CB, Selleri L (2006). Hox cofactors in vertebrate development. *Developmental Biology* **291**: 193-206.
- Monica K, Lebrun DP, Dederda DA, Brown R, Cleary ML (1994). Transformation properties of the E2a-Pbx1 chimeric oncoprotein: fusion with E2a is essential, but the PBX1 homeodomain is dispensable. *Molecular and Cellular Biology* **14**: 8304-8314.
- Morgado E, Albouhair S, Lavau C (2007). Flt3 is dispensable to the Hoxa9/Meis1 leukemogenic cooperation. *Blood* **109**: 4020-4022.
- Morgan BA (1997). Hox genes and embryonic development. *Poultry Science* **76**: 96-104.
- Palmqvist L, Argiropoulos B, Pineault N, Abramovich C, Sly LM, Krystal G *et al* (2006). The Flt3 receptor tyrosine kinase collaborates with NUP98-HOX fusions in acute myeloid leukemia. *Blood* **108**: 1030-1036.
- Paulsson K, Johansson B (2009). High Hyperdiploid Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. *Genes Chromosomes & Cancer* **48**: 637-660.
- Pineault N, Abramovich C, Ohta H, Humphries RK (2004). Differential and common leukemogenic potentials of multiple NUP98-Hox fusion proteins alone or with Meis1. *Molecular and Cellular Biology* **24**: 1907-1917.
- Pui CH, Gaynon PS, Boyett JM, Chessells JM, Baruchel A, Kamps W *et al* (2002). Outcome of treatment in childhood acute lymphoblastic leukaemia with rearrangements of the 11q23 chromosomal region. *Lancet* **359**: 1909-1915.
- Pui CH, Robison LL, Look AT (2008). Acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet* **371**: 1030-1043.
- Quere R, Karlsson G, Hertwig F, Rissler M, Lindqvist B, Fioretos T *et al* (2011). SMAD4 binds HOXA9 in the cytoplasm and protects primitive hematopoietic cells against nuclear activation by HOXA9 and leukemia transformation. *Blood*.
- Raman V, Martensen SA, Reisman D, Evron E, Odenwald WF, Jaffee E *et al* (2000). Compromised HOXA5 function can limit p53 expression in human breast tumours. *Nature* **405**: 974-978.
- Reardon DA, Hanson CA, Roth MS, Castle VP (1994). Lineage switch in Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. *Cancer* **73**: 1526-1532.
- Rulina AV, Spirin PV, Prassolov VS (2010). Activated leukemic oncogenes AML1-ETO and c-kit: Role in development of acute myeloid leukemia and current approaches for their inhibition. *Biochemistry-Moscow* **75**: 1650-1666.
- Samuel S, Naora H (2005). Homeobox gene expression in cancer: Insights from developmental regulation and deregulation. *European Journal of Cancer* **41**: 2428-2437.

- Sauvageau G, Lansdorp PM, Eaves CJ, Hogge DE, Dragowska WH, Reid DS *et al* (1994). Differential expression of homeobox genes in functionally distinct CD34+ subpopulations of human bone marrow cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**: 12223-12227.
- Sauvageau G, Thorsteinsdottir U, Eaves CJ, Lawrence HJ, Largman C, Lansdorp PM *et al* (1995). Overexpression of HOXB4 in hematopoietic cells causes the selective expansion of more primitive populations in vitro and in vivo. *Genes & Development* **9**: 1753-1765.
- Sauvageau G, Thorsteinsdottir U, Hough MR, Hugo P, Lawrence HJ, Largman C *et al* (1997). Overexpression of HOXB3 in hematopoietic cells causes defective lymphoid development and progressive myeloproliferation. *Immunity* **6**: 13-22.
- Shimada A, Taki T, Tabuchi K, Taketani T, Hanada R, Tawa A *et al* (2008). Tandem duplications of MLL and FLT3 are correlated with poor prognoses in pediatric acute myeloid leukemia: A study of the Japanese Childhood AML Cooperative Study Group. *Pediatric Blood & Cancer* **50**: 264-269.
- Slape C, Aplan PD (2004). The role of NUP98 gene fusions in hematologic malignancy. *Leukemia & Lymphoma* **45**: 1341-1350.
- Starkova J, Zamostna B, Mejstrikova E, Krejci R, Drabkin HA, Trka J (2010). HOX Gene Expression in Phenotypic and Genotypic Subgroups and Low HOXA Gene Expression as an Adverse Prognostic Factor in Pediatric ALL. *Pediatric Blood & Cancer* **55**: 1072-1082.
- Takeda A, Goolsby C, Yaseen NR (2006). NUP98-HOXA9 induces long-term proliferation and blocks differentiation of primary human CD34(+) hematopoietic cells. *Cancer Research* **66**: 6628-6637.
- Tedeschi FA, Cardozo MA, Valentini R, Zalazar FE (2010). Co-expression of HoxA9 and bcr-abl genes in chronic myeloid leukemia. *Leukemia & Lymphoma* **51**: 892-896.
- Thorsteinsdottir U, Mamo A, Kroon E, Jerome L, Bijl J, Lawrence HJ *et al* (2002). Overexpression of the myeloid leukemia-associated Hoxa9 gene in bone marrow cells induces stem cell expansion. *Blood* **99**: 121-129.
- Thorsteinsdottir U, Sauvageau G, Hough MR, Dragowska W, Lansdorp PM, Lawrence HJ *et al* (1997). Overexpression of HOXA10 in murine hematopoietic cells perturbs both myeloid and lymphoid differentiation and leads to acute myeloid leukemia. *Molecular and Cellular Biology* **17**: 495-505.
- Topisirovic I, Guzman ML, McConnell MJ, Licht JD, Culjkovic B, Neering SJ *et al* (2003). Aberrant eukaryotic translation initiation factor 4E-dependent mRNA transport impedes hematopoietic differentiation and contributes to leukemogenesis. *Molecular and Cellular Biology* **23**: 8992-9002.
- Topisirovic I, Kentsis A, Perez JM, Guzman ML, Jordan CT, Borden KLB (2005). Eukaryotic translation initiation factor 4E activity is modulated by HOXA9 at multiple levels. *Molecular and Cellular Biology* **25**: 1100-1112.
- Vijapurkar U, Fischbach N, Shen WF, Brandts C, Stokoe D, Lawrence HJ *et al* (2004). Protein kinase C-mediated phosphorylation of the leukemia-associated HOXA9 protein impairs its DNA binding ability and induces myeloid differentiation. *Molecular and Cellular Biology* **24**: 3827-3837.
- Wada H, Masuda K, Satoh R, Kakugawa K, Ikawa T, Katsura Y *et al* (2008). Adult T-cell progenitors retain myeloid potential. *Nature* **452**: 768-7710.

- Wang GG, Pasillas MP, Kamps MP (2005). Meis1 programs transcription of FLT3 and cancer stem cell character, using a mechanism that requires interaction with Pbx and a novel function of the Meis1 C-terminus. *Blood* **106**: 254-264.
- Wang N, Kim HG, Cotta CV, Wan M, Tang Y, Klug CA *et al* (2006). TGF beta/BMP inhibits the bone marrow transformation capability of Hoxa9 by repressing its DNA-binding ability. *Embo Journal* **25**: 1469-1480.
- Wermuth PJ, Buchberg AM (2005). Meis1-mediated apoptosis is caspase dependent and can be suppressed by coexpression of HoxA9 in murine and human cell lines. *Blood* **105**: 1222-1230.
- Whelan JT, Ludwig DL, Bertrand FE (2008). HoxA9 induces insulin-like growth factor-1 receptor expression in B-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* **22**: 1161-1169.
- Wiemels JL, Cazzaniga G, Daniotti M, Eden OB, Addison GM, Masera G *et al* (1999). Prenatal origin of acute lymphoblastic leukaemia in children. *Lancet* **354**: 1499-1503.
- Yamamoto K, Nakamura Y, Saito K, Furusawa S (2000). Expression of the NUP98/HOXA9 fusion transcript in the blast crisis of Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukaemia with t(7;11)(p15;p15). *British Journal of Haematology* **109**: 423-426.
- Yan JZ, Chen YX, Desmond A, Silva A, Yang YQ, Wang HR *et al* (2006). Cdx4 and Menin Co-Regulate Hoxa9 Expression in Hematopoietic Cells. *Plos One* **1**.
- Yassin ER, Sarma NJ, Abdul-Nabi AM, Dombrowski J, Han Y, Takeda A *et al* (2009). Dissection of the Transformation of Primary Human Hematopoietic Cells by the Oncogene NUP98-HOXA9. *Plos One* **4**.
- Ye M, Graf T (2007). Early decisions in lymphoid development. *Current Opinion in Immunology* **19**: 123-128.
- Zhang X, Zhu T, Chen Y, Mertani HC, Lee KO, Lobie PE (2003). Human growth hormone-regulated HOXA1 is a human mammary epithelial oncogene. *Journal of Biological Chemistry* **278**: 7580-7590